

PCT

REC'D 23 NOV 2004

WIFO



PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Reçu PCT

25 JAN 2005

| | | |
|--|--|--|
| Référence du dossier du déposant ou du mandataire | POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire International (formulaire PCT/PEA/416) | |
| Demande internationale No. PCT/FR 03/02339 | Date du dépôt international (jour/mois/année) 24.07.2003 | Date de priorité (jour/mois/année) 26.07.2002 |
| Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12Q1/68, C12Q1 | | |
| Déposant BIOCORTECH et al. | | |
| <p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire International, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 10 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent feuilles.</p> <p>3. Le présent rapport contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Base de l'opinion II <input type="checkbox"/> Priorité III <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle IV <input checked="" type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités VII <input type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale VIII <input type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale | | |
| Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 26.02.2004 | Date d'achèvement du présent rapport 24.11.2004 | |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international  Office européen des brevets - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tél. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016 | Fonctionnaire autorisé Pinta, V N° de téléphone +31 70 340-4049  | |

PCT/FR 03/02339

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n°

PCT/FR 03/02339

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport.)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

IV. Absence d'unité de l'invention

1. En réponse à l'invitation à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles, le déposant a :
- ☐ limité les revendications.
 - ☐ payé des taxes additionnelles.
 - ☐ payé des taxes additionnelles sous réserve.
 - ☐ ni limité les revendications ni payé des taxes additionnelles.
2. ☒ L'administration chargée de l'examen préliminaire international estime qu'il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité d'invention et décide, conformément à la règle 68.1, de ne pas inviter le déposant à limiter les revendications ou à payer des taxes additionnelles.
3. L'administration chargée de l'examen préliminaire international estime que, aux termes des règles 13.1, 13.2 et 13.3,
- ☐ il est satisfait à l'exigence d'unité de l'invention.
 - ☐ il n'est pas satisfait à l'exigence d'unité de l'invention, et ce pour les raisons suivantes :
4. En conséquence, les parties suivantes de la demande internationale ont fait l'objet d'un examen préliminaire international lors de la formulation du présent rapport :
- ☐ toutes les parties de la demande.
 - ☒ les parties relatives aux revendications nos 28-37 (entièrement), 38, 39 (partiellement) .

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

- | | | | |
|--|------|----------------|---|
| 1. Déclaration | | | |
| Nouveauté | Oui: | Revendications | 28-37 (entièrement), 38 et 39 (partiellement) |
| | Non: | Revendications | |
| Activité inventive | Oui: | Revendications | |
| | Non: | Revendications | 28-37 (entièrement), 38 et 39 (partiellement) |
| Possibilité d'application industrielle | Oui: | Revendications | 28-37 (entièrement), 38 et 39 (partiellement) |
| | Non: | Revendications | |

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Cette opinion fait référence aux documents suivants:

- D1: FUCHS MELANIE ET AL: "RNA editing in higher plant plastids: Oligoribonucleotide SSCP analysis allows the proof of base conversion directly at the RNA level" CURRENT GENETICS, vol. 39, no. 5-6, juillet 2001 (2001-07), pages 384-387.
- D2: ZHONG SHAOBIN ET AL: "Detection of apolipoprotein B mRNA editing by peptide nucleic acid mediated PCR clamping" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 259, no. 2, 7 juin 1999 (1999-06-07), pages 311-313.
- D3: NISWENDER COLLEEN M: "Strategies and requirements for the detection of RNA editing in G protein coupled-receptor RNA." METHODS IN ENZYMOLOGY. UNITED STATES 2002, vol. 343, 2002, pages 476-492.
- D4: MAEKAWA MASATO ET AL: "Relative ratios of mRNA molecules encoded by genes with homologous sequences using fluorescence-based single-strand conformation polymorphism analysis" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 223, no. 3, 1996, pages 520-525.
- D5: IBRAHIM A F ET AL: "Differential expression of potato U1A spliceosomal protein genes: a rapid method for expression profiling of multigene families." PLANT MOLECULAR BIOLOGY. MAR 2001, vol. 45, no. 4, mars 2001 (2001-03), pages 449-460.
- D6: ELLISON JANE S: "Fluorescence-based mutation detection: Single-strand conformation polymorphism analysis (F-SSCP)" MOLECULAR BIOTECHNOLOGY, vol. 5, no. 1, 1996, pages 17-31.
- D7: WO 02/38809 A (INGENY HOLDING BV; VOS GERRIT JOHANNIS DE (NL)) 16 mai 2002 (2002-05-16).

Concernant le point IV

Absence d'unité de l'invention

1 L'Autorité en charge de l'examen préliminaire international est d'accord avec l'objection formulée par l'Autorité en charge de la recherche internationale quant au manque d'unité de l'invention; les arguments présentés dans l'annexe au Rapport de recherche partiel (Invitation à payer des taxes additionnelles; formulaire PCT/ISA/206) sont maintenus dans leur entier (voir également les Directives pour la recherche internationale et l'examen préliminaire international PCT, 10.71-10.77). Lesdits arguments sont exposés de nouveau ci-après.

1.1 La présente demande ne satisfait pas aux dispositions de la Règle 13.1 PCT car elle concerne une pluralité d'inventions qui ne sont pas liées entre elles en formant un seul concept inventif général.

1.2 Les inventions 1 et 2 sont liées par le concept commun de mettre à disposition des produits ou méthodes utilisables pour la détection et/ou la quantification des formes éditées ou non-éditées d'un ARN.

1.3 Or, des produits ou méthodes utilisables pour la détection et/ou la quantification des formes éditées ou non-éditées d'un ARN sont connus dans l'art antérieur. Par exemple, Fuchs et al. (Current Genetics (2001) 39: 384-387) (D1) décrivent la détection d'événements d'édition par conversion par la méthode de rSSCP, Zhong et al. (Biochem. Biophys. Res. Comm. (1999) 259: 311-313) (D2) décrivent une méthode pour détecter l'édition de l'ARN comprenant l'utilisation d'un PNA ("peptid nucleic acid") permettant de bloquer l'amplification par PCR de l'ARN non édité et de détecter sélectivement l'ARN édité, et Niswender et al. (Meth. Enzymol. (2002) 343: 476-492) (D3) décrivent la détection d'événements d'édition de l'ARN du récepteur humain 5-HT_{2C} de la sérotonine par introduction de sites de restrictions spécifiques des formes éditées ou non-éditées, extension d'amorce, ou RT-PCR suivie de séquençage.

1.4 Au vu de cet état de l'art, le concept commun aux inventions 1 et 2 n'est pas nouveau, et le problème résolu par la présente demande peut être reformulé comme étant de mettre à disposition des produits ou méthodes alternatifs utilisables pour la détection et/ou la quantification des formes éditées ou non-éditées d'un ARNm.

1.5 Les solutions apportées à ce problème consistent en la mise à disposition d'une part de jeux de sondes oligodésoxyribonucléotidiques où au moins un des nucléotides dG sur au moins une desdites sondes a été substitué par un nucléotide dI, et produits, procédés et méthodes faisant usage desdits jeux de sondes (invention 1), et d'autre part de méthodes basées sur la détection de polymorphismes de conformation de simples brins (SSCP) (invention 2).

1.6 Les solutions apportées au problème ne pouvant être réunies par aucune caractéristique inventive ou relation technique particulière, et du fait qu'aucune autre caractéristique technique particulière au sens de la Règle 13.2 PCT commune à toutes les inventions n'a pu être identifiée par l'administration chargée de la recherche internationale, il n'est pas possible de définir un concept général inventif sous-tendant les inventions 1 et 2.

1.7 En conséquence, la présente demande comporte un défaut d'unité d'invention et ne satisfait pas aux critères établis par la Règle 13.1 PCT. Les différentes inventions sont donc formulées comme suit:

1.7.1 Invention 1: revendications 1-27 (entièrement), 38 et 39 (partiellement); jeu d'au moins deux sondes oligodésoxyribonucléotidiques différentes pour la détection et/ou quantification d'un oligonucléotide dérivé d'un fragment d'un ARNm codant pour un récepteur membranaire de cellule de mammifère où au moins un des nucléotides dG sur au moins une desdites sondes a été substitué par un nucléotide dI, biopuce, réacteur, dispositif et kit comprenant un tel jeu d'au moins deux sondes, utilisation de ladite biopuce ou dudit dispositif, procédés pour la détection et/ou quantification d'oligonucléotides ou pour la détermination du pourcentage de chacune des formes éditées ou non-éditées d'un ARNm dans un échantillon comprenant l'utilisation de ladite biopuce ou dudit dispositif, et méthodes de sélection de composés employant ledit procédé pour la détection et/ou quantification d'oligonucléotides.

1.7.2 Invention 2: revendications 28-37 (entièrement), 38 et 39 (partiellement); méthodes SSCP pour l'obtention du profil et/ou du taux d'édition d'un ARNm, méthodes de sélection de composés ou de diagnostic utilisant lesdites méthodes SSCP.

1.8 Les inventions 1 et 2 ont fait l'objet d'un Rapport de recherche internationale.

2 Suivant le souhait de la Demanderesse de voir porter l'examen international, pour lequel une seule taxe d'examen a été payée, sur le second groupe d'inventions (revendications 28-37 (entièrement), 38, 39 (partiellement)), cette opinion a été restreinte à l'invention 2 telle qu'indiquée ci-dessus.

Concernant le point V

Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1 NOUVEAUTE (Art. 33(2) PCT)

1.1 Le document D4, qui parmi les documents cités dans le Rapport de recherche internationale présente le plus de caractéristiques techniques communes avec l'objet de la revendication 28, décrit une méthode SSCP pour l'analyse d'ARNm qui diffère de la méthode selon la revendication 28 en ce que la séparation des ADN simple brin se fait par électrophorèse sur gel (voir "SSCP analysis" p. 521-522) et non par électrophorèse capillaire.

1.2 Au vu de l'état de l'art cité dans le Rapport de recherche internationale, l'objet des revendications 28-37 (complètement), 38 et 39 (partiellement) est nouveau au sens de l'Article 33(2) PCT.

2 ACTIVITE INVENTIVE (Art. 33(3) PCT)

2.1 Le document D1, considéré comme l'état de l'art le plus proche par rapport à l'objet des revendications 28 et 33, décrit une méthode SSCP permettant d'obtenir le profil et le taux d'édition d'un ARN pouvant être édité, à partir d'un échantillon de cellules eucaryotes (p. 385, col. 1, "Plant growth..."), comprenant les étapes d'extraction des ARN chloroplastiques totaux de l'échantillon, digestion par la Rnase T1, fractionnement par chromatographie d'échange d'ions puis rSSCP et détection par hybridation avec une sonde radioactive (p. 385, col. 2 à p. 386, col. 1 et fig. 1).

2.2 L'objet des revendications 28 et 33 diffère de D1 en ce que la méthode employée comprend une étape d'amplification par RT-PCR précédant la détection par SSCP, avec séparation des ADN-simple brin par électrophorèse capillaire et détection de la fluorescence.

2.3 Le problème que se propose de résoudre la présente invention peut donc être considéré comme étant de fournir une méthode SSCP améliorée permettant d'obtenir le profil d'édition (rev. 28), ou le profil d'édition et le taux d'édition (rev. 33) d'un ARNm

pouvant être édité avec une plus grande sensibilité.

2.4 La solution proposée consiste en l'utilisation d'une méthode d'amplification par RT-PCR préalablement à la détection par SSCP avec séparation des ADN simple brin par électrophorèse capillaire et détection de la fluorescence.

2.5 Cette solution ne peut cependant pas être considérée comme impliquant une activité inventive pour les raisons suivantes:

2.5.1 La revendication 28 lit "Méthode SSCP permettant [...] d'obtenir le profil d'édition d'un ARNm *pouvant être édité*" (emphase ajoutée). L'ARNm analysé par la méthode de la revendication 28 n'est donc pas nécessairement effectivement édité. D'autre part, au vu de la définition de l'édition donnée à la page 10 de la description de la présente demande (désamination des adénosines en inosines) ainsi que la définition beaucoup plus générale donnée dans le document D3 (p. 476, Introduction, l. 1-3: tout événement de modification de l'ARN (épissage exclu) aboutissant à un messenger dont la séquence diffère de l'ADN génomique correspondant), il est clair que la détermination du profil d'édition d'un ARNm est un cas particulier de détermination de variations de séquence présentes au niveau de l'ARNm.

2.5.2 Le document D4 décrit une méthode SSCP pour la détermination de variations de séquence présentes au niveau de l'ARNm, en particulier de deux séquences homologues codant les sous-unités A et B de la lactate déshydrogénase, comprenant les étapes d'extraction des ARN totaux de l'échantillon, **transcription inverse des ARN extraits et synthèse de l'ADNc double brin** (p. 521, "RNA preparation and cDNA synthesis"), d'amplification par PCR des ADNc à l'aide d'un couple d'amorces spécifiques dudit ARNm, ce couple d'amorces étant choisi de manière à pouvoir amplifier toutes les formes de cet ARNm présentant des variations de séquences, et ces amorces étant marquées par des fluorophores (p. 521, "Design and synthesis of fluorescence-labeled primers", "Procedure of PCR", et fig. 1), de dissociation des ADN double brin en ADN simple brin (p. 522, l. 3), de séparation des ADN simple brin par électrophorèse et l'obtention du profil de variation de séquence par **lecture de la fluorescence** (p. 522, l. 4-7; fig. 2).

2.5.3 Le document D5 décrit une méthode SSCP pour la détermination de variations de séquence présentes au niveau de l'ARNm, en particulier deux fragments différant par deux mutations ponctuelles (fig. 4) provenant de gènes de la famille U1A, comprenant les étapes d'extraction des ARN totaux des échantillons (p. 450, col. 2, "Nucleic acid extraction..."), **transcription inverse des ARN, synthèse de l'ADNc double brin et**

amplification par PCR à l'aide d'un couple d'amorces spécifiques dudit ARNm permettant d'amplifier les différentes formes de l'ARNm potentiellement présentes (p. 451, col. 1, "RT-PCR..."; fig. 4), la dissociation des ADN double brin en ADN simple brin (implicite dans toute méthode SSCP), la séparation des ADN simple brin par électrophorèse sur gel et l'acquisition du profil (p. 451, col. 1, "Single-stranded conformational polymorphism (SSCP)"; fig. 4).

2.5.4 Au vu des documents D4 ou D5, il est clair que la procédure de RT-PCR couplée à l'analyse SSCP est bien connue dans l'art de la détection de variations de séquences entre molécules d'ARNm de séquences apparentées.

2.5.5 La personne du métier, confrontée au problème à résoudre tel que défini au point 4.3, considèrerait comme une solution évidente de modifier la méthode selon D1 en introduisant une étape de RT-PCR préalable à la détection par SSCP selon D4 ou D5 ainsi que la détection par fluorescence selon D4, de manière à augmenter la sensibilité de la détection des variations de séquences d'un ARNm pouvant être édité.

2.5.6 Le fait que l'étape de détection soit réalisée par électrophorèse capillaire dans les revendications 28 et 33 au lieu d'une électrophorèse sur gel dans les méthodes décrites dans D4 et D5 n'est pas considéré comme impliquant une activité inventive, car les deux méthodes sont des équivalents bien connus de la personne du métier (pour illustration de l'électrophorèse sur gel, voir D6; pour l'électrophorèse capillaire, voir D7).

2.5.7 Les revendications dépendantes 29-32 ne contiennent aucune caractéristique qui, en combinaison avec celles de l'une quelconque des revendications à laquelle elles se réfèrent, définisse un objet qui satisfasse aux exigences du PCT en ce qui concerne l'activité inventive, et ce pour les raisons suivantes: des sites d'édition du récepteur 5-HT_{2c} sont bien connus (voir D3, fig. 2) et constituent donc un ensemble d'alternatives parmi de nombreuses autres possibilités pour appliquer la méthode de détection par SSCP.

2.5.8 Les revendications indépendantes 34-39 n'impliquent pas non plus d'activité inventive, car il s'agit d'utilisations habituelles dans l'art (i.e. pour la sélection de composés ou le diagnostic) d'une méthode de détection n'impliquant pas elle-même d'activité inventive.

2.6 Au vu de ce qui précède, la présente demande ne satisfait pas aux exigences de l'Article 33(3) PCT, car l'objet des revendications 28-37 (entièrement), 38 et 39 (partiellement) n'implique pas une activité inventive.

3 POSSIBILITE D'APPLICATION INDUSTRIELLE (Art. 33(4) PCT)

3.1 L'objet des revendications 28-39 est susceptible d'application industrielle au sens de l'Art. 33(4) PCT.